

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.11.014

脑脉泰胶囊对外周神经元损伤模型斑马鱼神经再生的影响

钟小清¹, 朱晓宇², 徐懿乔², 何胜旭¹✉

1. 桂林三金药业股份有限公司, 广西壮族自治区桂林市金星路 1 号, 541004; 2. 杭州环特生物科技有限公司

摘要 目的 探讨脑脉泰胶囊治疗脑梗死的可能作用机制。方法 脑脉泰胶囊用超纯水溶解成 50、100、250、500、1000、1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 6 个浓度, 均分别处理 30 尾野生型 AB 系斑马鱼 24 h 后, 统计各组斑马鱼死亡数量, 绘制浓度效应曲线, 并计算最大非致死浓度, 筛选实验药物浓度。取受精后 1 天运动神经元转基因荧光斑马鱼, 分为空白对照组、模型组、阳性对照组和脑脉泰胶囊高、中、低剂量组, 每组 30 尾。除空白对照组外, 其余各组斑马鱼用 1.5% 乙醇诱导处理斑马鱼 48 h 建立斑马鱼外周运动神经元损伤模型。造模结束后, 阳性对照组给予 L-甲状腺素钠 0.08 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 空白对照组和模型组给予养鱼用水, 脑脉泰胶囊低、中、高剂量组分别给予筛选浓度的脑脉泰胶囊处理 24 h。药物处理结束后, 利用图像处理软件测量外周运动神经元的长度, 计算促神经再生率。结果 脑脉泰胶囊浓度在 50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 斑马鱼无死亡; 浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时斑马鱼开始出现死亡, 根据浓度效应曲线得出脑脉泰胶囊最大非致死浓度为 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 故本研究选取 17、57、170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 为脑脉泰胶囊低、中、高剂量组干预浓度。与空白对照组比较, 模型组斑马鱼外周运动神经元长度显著缩短 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阳性对照组和脑脉泰胶囊低、中、高剂量组斑马鱼外周运动神经元长度增加 ($P < 0.01$); 与阳性对照组比较, 脑脉泰胶囊中、高剂量组斑马鱼外周运动神经元长度差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而脑脉泰胶囊低剂量组斑马鱼外周运动神经元长度降低 ($P < 0.01$)。阳性对照组和脑脉泰胶囊低、中、高组促神经再生率分别为 31%、17%、29%、30%。结论 脑脉泰胶囊对外周神经元具有促神经再生作用, 可能为其治疗脑梗死作用机制之一。

关键词 脑梗死; 脑脉泰胶囊; 斑马鱼; 神经损伤; 神经元长度

脑梗死又称缺血性卒中, 中医学称之为卒中或中风, 是指由各种原因所致的局部脑组织区域血液供应障碍, 出现脑组织缺血、缺氧, 发生病变坏死, 进而产生临床上对应的神经功能缺失表现^[1]。脑梗死恢复期是急性期到后遗症期的过渡阶段, 此阶段留有不同程度的神经功能缺损, 且有复发可能, 是决定患者预后及生活能力的关键时期, 也是临床治疗的重要时期。脑脉泰胶囊具有益气活血、熄风豁痰的功效, 可用于脑梗死恢复期患者。既往研究表明, 脑脉泰胶囊治疗缺血性脑梗死有效率可达 96.79%^[2], 可显著改善脑梗死患者的神经功能和日常生活能力评分^[3]。斑马鱼是一种与人类同源性较高的脊椎动物, 具有容易获得、生长快速、

给药方便、胚胎透明等特性, 在构建中枢神经系统疾病模型方面具有重要的效用, 是研究中枢神经系统疾病和药物研发的重要工具^[4]。本研究通过建立斑马鱼外周运动神经元损伤模型, 观察脑脉泰胶囊的干预作用, 为进一步阐明脑脉泰胶囊改善脑梗死患者神经功能的可能机制提供数据支持。本研究符合实验动物伦理学相关要求。

1 材料与方法

1.1 实验动物

野生型 AB 系斑马鱼, 受精后 1 天 (1 dpf), 运动神经元转基因荧光斑马鱼, 1 dpf, 由杭州环特生物科技有限公司提供, 实验动物使用许可证号为 SYXK (浙) 2012-0171。饲养于 28 $^{\circ}\text{C}$ 的养鱼用水中 (水质: 每 1 L 反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐, 电导率为 480 ~ 510 $\mu\text{S}/\text{cm}$; pH 值为 6.9 ~ 7.2; 硬度为 53.7 ~ 71.6 mg/L CaCO_3)。

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划(桂科能 12237021)

✉ 通讯作者: heshengxu@163.com, (0773) 5843106

1.2 药物

脑脉泰胶囊 (由红参、三七、当归、丹参、鸡血藤、红花、银杏叶、菊花、石决明、何首乌、石菖蒲组成, 国药准字 Z19980094, 批号 140904, 规格 0.5 g/粒, 桂林三金药业股份有限公司), 用时倒出胶囊内容物, 用超纯水溶解至相应浓度。

1.3 主要试剂及仪器

L-甲状腺素钠 (上海晶纯试剂有限公司, 批号 55-03-8); 乙醇 (杭州龙山精细化工, 批号 64-17-5)。荧光显微镜 (型号 AZ100, 日本尼康公司)。

1.4 脑脉泰胶囊最大非致死浓度的筛选

脑脉泰胶囊用超纯水溶解, 通过预实验结果设置 6 个初始检测浓度, 分别为 50、100、250、500、1000、1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 每个浓度均处理 30 尾野生型 AB 斑马鱼。同时设置空白对照, 给予养鱼用水。处理 24 h 后, 统计各组的斑马鱼死亡数量, 使用 Origin 8.0 统计学软件绘制最佳的浓度效应曲线, 并计算最大非致死浓度。

1.5 脑脉泰胶囊对外周神经损伤斑马鱼模型的影响

取 1 dpf 运动神经元转基因荧光斑马鱼, 实验分为空白对照组、模型组、阳性对照组和脑脉泰胶囊高、中、低剂量组, 每组 30 尾。除空白对照组外, 其余各组斑马鱼用 1.5% 乙醇诱导处理斑马鱼 48 h, 建立斑马鱼外周运动神经元损伤模型^[9]。造模结束后, 阳性对照组给予超纯水溶 L-甲状腺素钠 0.08 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 空白对照组和模型组给予养鱼用水, 脑脉泰胶囊各剂量组分别给予筛选浓度的脑脉泰胶囊处理 24 h。药物处理结束后, 按简单随机抽样法每组随机挑选 10 尾斑马鱼, 在荧光显微镜下拍照, 利用图像处理软件 NIDS-Element's 进行图像分析, 定量外周运动神经元的长度 (L), 计算促神经再生率, 计算公式如下:

$$\text{促神经再生率}(\%) = \frac{L(\text{药物组}) - L(\text{模型组})}{L(\text{空白组}) - L(\text{模型组})} \times 100\%$$

1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件分析, 计量资料符合正态分布用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析和 Dunnett's *T* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑脉泰胶囊最大非致死浓度筛选结果

表 1 示, 脑脉泰胶囊浓度在 50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 斑马鱼无死亡; 浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时斑马鱼开始出现死亡, 随着浓度的增加斑马鱼死亡率逐渐升

高。利用 OriginPro 8.0 软件模拟曲线 (图 1) 求得脑脉泰胶囊最大非致死浓度为 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 故本研究选取 17、57 和 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 为脑脉泰胶囊低、中、高剂量组干预浓度。

表 1 不同浓度脑脉泰胶囊对斑马鱼致死情况

浓度	样本数/尾	死亡数/尾	死亡率/%
空白对照	30	0	0
50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	30	0	0
100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	30	0	0
250 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	30	1	3.3
500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	30	13	43.3
1000 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	30	30	100
1500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	30	30	100

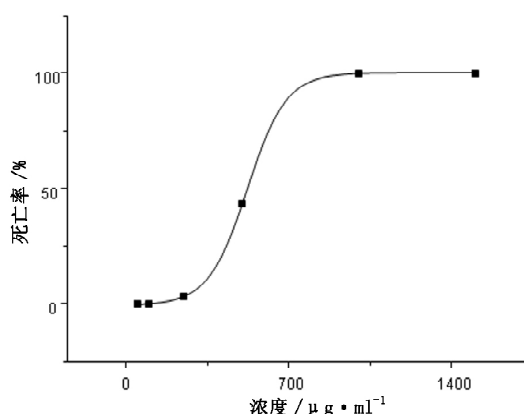


图 1 脑脉泰胶囊干预斑马鱼的浓度-致死曲线

2.2 各组斑马鱼外周运动神经元长度比较

表 2 示, 与空白对照组比较, 其余各组斑马鱼外周运动神经元长度显著缩短 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阳性对照组和脑脉泰胶囊低、中、高剂量组斑马鱼外周运动神经元长度增加 ($P < 0.01$); 与阳性对照组比较, 脑脉泰胶囊中、高剂量组斑马鱼外周运动神经元长度差异无统计意义 ($P > 0.05$), 而脑脉泰胶囊低剂量组斑马鱼外周运动神经元长度缩短 ($P < 0.01$); 与脑脉泰胶囊低剂量组比较, 脑脉泰胶囊中、高剂量组斑马鱼外周运动

表 2 各组斑马鱼外周运动神经元长度比较 (像素, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	外周运动神经元长度
空白对照组	10	221 $\pm$ 3.2
模型组	10	148 $\pm$ 2.8 ^{a)}
阳性对照组	10	170 $\pm$ 2.1 ^{a) b)}
脑脉泰胶囊低剂量组	10	160 $\pm$ 2.9 ^{a) b) c)}
脑脉泰胶囊中剂量组	10	169 $\pm$ 2.4 ^{a) b) d)}
脑脉泰胶囊高剂量组	10	170 $\pm$ 1.9 ^{a) b) d)}

注: a) 与空白对照组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与阳性对照组比较, $P < 0.01$; d) 与脑脉泰胶囊低剂量组比较, $P < 0.01$ 。

神经元长度增加 ($P < 0.01$); 脑脉泰胶囊中、高剂量组斑马鱼外周运动神经元长度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组斑马鱼神经元再生情况见图 2 (请扫描二维码获取)。阳性对照组和脑脉泰胶囊低、中、高剂量组促神经再生率分别为 31%、17%、29%、30%。

3 讨论

中医药治疗脑梗死恢复期具有一定的优势, 治则以补气血、强肝肾、活血化瘀为主^[8]。脑脉泰胶囊以红参大补元气, 补脾益肺; 三七补益气血, 化瘀通脉; 当归、丹参、鸡血藤、红花、银杏叶活血化瘀; 菊花、石决明、何首乌、石菖蒲滋阴潜阳, 平肝熄风, 豁痰开窍; 诸药合用可益气活血、化瘀通络、清心安神。药效学研究表明, 脑脉泰胶囊可通过提高脑组织神经生长因子和降低胶质纤维酸性蛋白表达来改善慢性脑缺血大鼠的认知功能^[9], 还能增加实验大鼠海马局部脑血流量, 抑制海马神经细胞凋亡^[8]。

目前斑马鱼模型在帕金森综合征、抑郁症、癫痫、阿尔茨海默病等中枢神经系统疾病研究中得到了广泛应用, 在神经系统组织器官的再生学研究中已显示出独特的优势^[10]。西医治疗神经损伤疾病主要是使用营养神经药物, 但其作用机制单一, 疗效仍不够理想^[11]。L-甲状腺素钠具有促进神经生长发育的功能, 通常作为该模型的阳性对照药物^[8]。本研究结果显示, 脑脉泰胶囊中、高剂量组斑马鱼外周运动神经元长度与阳性对照组差异无统计学意义, 但明显高于脑脉泰胶囊低剂量组, 而脑脉泰胶囊低、中、高剂量组促神经再生率分别为 17%、29%、30%, 说明脑脉泰胶囊对外周运动神经元损伤的斑马鱼促神经再生作用呈浓度依赖性, 且中、高剂量的脑脉泰胶囊与阳性对照药 L-甲状

腺素钠效果相当, 具有神经损伤的保护作用。由于复方中成分复杂, 本次实验显示脑脉泰胶囊对斑马鱼的最大非致死浓度为 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 限制了更高浓度实验的选择, 未来将通过分离纯化进一步提高实验的药物浓度, 明确起效的药用部位, 并选择更高等级的实验动物验证其作用, 为脑脉泰胶囊改善脑梗死患者神经功能的机理研究提供依据。

参考文献

- [1] 周仲瑛. 中医内科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 304-315.
- [2] 张春, 王建国, 邹文孝, 等. 脑脉泰胶囊治疗缺血性脑梗死的临床研究 [J]. 中国医药指南, 2008, 6(20): 74.
- [3] 刘新生, 陈江波, 徐海芳, 等. 脑脉泰胶囊对急性脑梗死患者预后的影响 [J]. 中国医刊, 2014, 49(10): 58-60.
- [4] 郭弘扬, 唐天乐, 朱晓鹏. 斑马鱼模型在中枢神经系统疾病中的研究进展 [J]. 中国海洋药物, 2020, 39(3): 71-79.
- [5] SYLVAIN NJ, BREWSTER DL, ALI DW. Zebrafish embryos exposed to alcohol undergo abnormal development of motor neurons and muscle fibers [J]. Neurotoxicol Teratol, 2010, 32(4): 472-480.
- [6] 中国中西医结合学会神经科专业委员会. 中国脑梗死中西医结合诊治指南 (2017) [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(2): 136-144.
- [7] 牟静静, 孟星, 孟盼盼, 等. 脑脉泰对慢性脑缺血大鼠认知功能的保护作用及其机制研究 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 32(1): 21-24.
- [8] 张海宁, 孙莉, 汤跃宇, 等. 脑脉泰对慢性脑缺血致血管性痴呆大鼠脑血流量及海马神经元凋亡的影响 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2009, 36(4): 290-293.
- [9] 严丽锋, 顾爱华. 斑马鱼在再生医学研究中的应用及进展 [J]. 遗传, 2013, 35(7): 856-866.
- [10] 徐北辰. 神经损伤的药物治疗研究进展 [J]. 辽宁医学院学报, 2014, 35(4): 99-101.

Effects of Naomaitai Capsule (脑脉泰胶囊) on Nerve Regeneration in Zebrafish Model with Peripheral Neuronal Injury

ZHONG Xiaoqing¹, ZHU Xiaoyu², XU Yiqiao², HE Shengxu¹

1. Guilin Sanjin Pharmaceutical Company, Guilin, 541004; 2. Hunter Biotechnology, Inc.

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of Naomaitai Capsule (脑脉泰胶囊) for treatment of cerebral infarction. **Methods** Ultrapure water was used to dissolve Naomaitai Capsules; the solutions of Naomaitai Capsules at different concentrations of 50, 100, 250, 500, 1000, and 1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were used to keep 30 wild-type AB zebrafish for 24 hours, respectively. The number of zebrafish deaths in each group was counted; the concentration-effect curve was drawn; the maximum non-lethal concentration was calculated; and the suitable concentration used for the experiment was screened. The transgenic zebrafish with fluorescent motor neurons one day after fertilization were grouped into blank control group, model group, positive control group, Naomaitai Capsule high, medium and low

dose group, with 30 zebrafish in each group. Ethanol (1.5%) was used on zebrafish for 48 hours to establish the model of peripheral neuronal injury in all groups except for blank control group. After modelling, L-thyroxine sodium at concentration of 0.08 $\mu\text{mol/L}$ was given to positive control group, and fish-farming water was used in blank control group and model group; *Naomaitai Capsules* at the screened concentrations were given to zebrafish for 24 hours in *Naomaitai Capsule* low, medium and high dose groups, respectively. After the interventions, the image processing software was used to measure the neuronal length of peripheral motor neurons, and the nerve regeneration rate was calculated. **Results** There was no deaths of zebrafish when the concentration of *Naomaitai Capsule* solution was 50 or 100 $\mu\text{g/ml}$, and zebrafish began to die when the concentration was 250 $\mu\text{g/ml}$. According to the concentration-effect curve, the maximum non-lethal concentration was 170 $\mu\text{g/ml}$, and therefore the concentrations used in the *Naomaitai Capsule* low, medium and high dose group were set as 17, 57 and 170 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The length of peripheral motor neurons of zebrafish in model group was significantly shorter than that of blank control group ($P < 0.01$), and that in positive control group, *Naomaitai Capsule* low, medium and high dose groups was longer than that in the model group ($P < 0.01$); There was no significant difference in length of peripheral motor neurons in comparison with positive control group, *Naomaitai Capsule* medium and high dose groups ($P > 0.05$), while there was significantly decreased length of peripheral motor neurons in *Naomaitai Capsule* low dose group ($P < 0.01$). The nerve regeneration rate of positive control group, *Naomaitai Capsule* low, medium and high dose groups were 31%, 17%, 29%, and 30% respectively. **Conclusion** The effect of *Naomaitai Capsule* on promoting nerve regeneration of peripheral neurons may be related to its mechanisms of treating cerebral infarction.

Keywords cerebral infarction; *Naomaitai Capsule* (脑脉泰胶囊); Zebrafish; nerve injury; neuronal length

(收稿日期: 2020-11-26; 修回日期: 2021-01-15)

编辑: 邓 媛

珍贵文献 临床科研必备《中医杂志》光盘合订本

《中医杂志》光盘检索系统收录了1951年~2013年出版发行的《中医杂志》所有期刊(繁体字已转为简体字)。您可借助计算机阅读收录的任意一篇文章,而且可对光盘进行任意词或多组合条件检索,检索结果可以打印或下载保存。您可以在几秒钟内就能检索到某种疾病、某种疗法或某种药的相关文章,本光盘可按自然年、期排序,方便阅读与保存。1951年~1986年光盘还收录了扫描的原文版面图像。

邮购地址:北京东直门内南小街16号中医杂志社,邮政编码:100700

电话:(010) 64035632 联系人:杨秋雷(请在汇款单附言栏写明购买者的电话)

1951年~1986年光盘合订本每套(4张光盘)480元

1987年~1994年光盘合订本每套(1张光盘)260元

1995年~2004年光盘合订本每套(1张光盘)280元

2005年~2013年光盘合订本每套(1张光盘)300元



欢迎关注《中医杂志》公众号

科技精品光盘全文检索管理系统3.5-《中医杂志》(1987-1994)

系统工具 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

